



## Nagoya City University Academic Repository

学位の種類	博士（医学）
報告番号	甲第1734号
学位記番号	第1231号
氏名	市川 紘
授与年月日	令和2年3月25日
学位論文の題名	<p>Antitumor Effect of a Novel Photodynamic Therapy With Acetylated Glucose-conjugated Chlorin for Gastrointestinal Cancers (アセチル基を結合させた新規糖鎖連結光感受性物質を用いた光線力学療法の検討)</p> <p>Anticancer Res. 2019; 39(8): 4199-4206.</p>
論文審査担当者	主査： 瀧口 修司

## 論文内容の要旨

【目的】光線力学療法（PDT）は様々な領域で臨床応用されており，消化器領域では化学放射線療法後の遺残再発食道癌に対し，Talaporfin sodium (TS)を用いた PDT が保険収載されている。我々は以前から癌細胞が正常細胞より多くの糖を取り込む性質(Warburg 効果)を応用して糖を連結した PS の開発を行っており，代謝、抗腫瘍効果にすぐれた Gcholrin e6 を開発した。ただし代謝が非常に早く、十分な腫瘍集積を得られているとは考えにくい状況であった。そのため排泄を遅らせつつ腫瘍集積性の向上と低毒性を目指して、新たに Gcholrin e6 ヘアセチル基を結合させた AcN003HP を開発した。今回我々は AcN003HP を用いた光線力学療法の抗腫瘍効果などについて検討を行った。

【方法】1. 食道扁平上皮癌細胞株(OE21)，胃癌細胞株(MKN45)，大腸癌細胞株(HT29)に対し AcN003HP を投与後 660nm の LED 照射を行い，50%殺細胞濃度を TS と比較した。2. MKN45 細胞株へ  $1\mu\text{mol/L}$  AcN003HP 投与し，共焦点顕微鏡下を用いて薬剤の細胞内局在を観察した。3. MKN45 細胞株へ  $1\mu\text{mol/L}$  AcN003HP を投与後フローサイトメーターで蛍光を測定し，細胞内への薬剤の取り込みを比較した。4. MKN45 細胞株へ  $1\mu\text{mol/L}$  AcN003HP 及び Singlet Oxygen Sensor Green Reagent を投与後，660nm の LED 照射を行った後にプレートリーダーで蛍光を測定し，一重項酸素発生の比較検討を行った。5. 同種移植腫瘍モデルを用いて  $1.56\mu\text{mol/kg}$  の Gcholrin e6，AcN003HP を尾静脈注射で投与し，投与後 30 分毎にスペクトロメーターで蛍光の測定を行った。6. 同種移植腫瘍モデルを用いて  $1.56\mu\text{mol/kg}$  の TS，AcN003HP を尾静脈注射 90 分後に薬剤を投与しないコントロールを含め 664nm， $100\text{J/cm}^2$  のレーザー照射を行い 3 群で PDT 効果を検証した。腫瘍を 3 日ごとに計測を行い、腫瘍量の評価を行った。

【結果】1.AcN003HP は TS と比較して 12,500～38,000 倍と高い抗腫瘍効果を示した。2. AcN003HP は小胞体に取り込まれていた。3. AcN003HP は TS と比較して細胞内への高い取り込みを認めた。4. AcN003HP は TS よりも多くの一重項酸素を惹起した ( $p<0.01$ )。4. 薬剤の腫瘍への取り込みのピークは Gcholrin e6 では 30 分，AcN003HP では 90 分であった。5. 皮下腫瘍モデルでは，TS 群は有害事象により全例死亡したが，AcN003 群ではコントロール群と比較して有意に腫瘍増大を抑制した。

【考察】PDT では光化学反応によって誘導された活性酸素、一重項酸素によってアポトーシス、ネクローシスが誘導されているといわれている。また小胞体に、ゴルジ体において発生した一重項酸素を由来として ER・Ca+チャンネルの障害によりアポトーシスを誘導されているとの報告されている。今回我々が開発した AcN003HP はほかの光感受性物質よりも多くの一重項酸素を発生させており、小胞体に局在しているという結果であった。また Gcholrin e6 よりも 60 分ほど取り込みのピークを遅らせることができた。そのため第 2 世代の TS よりも高い殺細胞効果を示した可能性があると考えられた。同条件で行った PDT においても、AcN003HP は全例有害事象、死亡する例がなく、安全に治療を行える薬剤であるという可能性を示した。

## 論文審査の結果の要旨

【背景】現在本邦では、化学放射線療法後の遺残再発食道癌に対する光線力学療法(Photodynamic therapy: PDT)として第2世代のTalaporfin sodium (TS)を用いたPDTが保険収載され、その有用性が報告されている。しかし、その抗腫瘍効果、腫瘍選択性、集積性は不十分で、更なる改良が必要である。我々は癌細胞が多く糖（グルコース）を取り込む性質：Warburg効果を応用し、糖連結クロリンを開発してきた。その中でも既報のグルコース結合chlorin e6 (G-chlorin e6)は非常に強力な抗腫瘍効果、高い腫瘍選択性を発揮した。しかし、薬剤の体外排泄速度が非常に速く、そのため腫瘍集積性、抗腫瘍効果を十分に発揮できていない可能性が示唆された。本研究では、薬剤排泄を遅延させる目的で、アセチル基を結合させたAcN003HPを開発し、その効果を検討した。

【目的】排泄時間を調整する目的でAcN003HPを開発し、腫瘍集積性及び抗腫瘍効果を検討した。

【方法・結果】AcN003HPを用いて以下の実験を施行した。

① IC50による*in vitro*での抗腫瘍効果の検討では、AcN003HPはTSと比べて非常に強力な殺細胞効果を示した（約8,000倍から32,000倍）。②フローサイトメトリーによる薬剤の取り込み比較では、AcN003HPはTSと比べて約1,000倍取り込まれた。③共焦点レーザー顕微鏡による細胞内局在の検討では主に小胞体に取り込まれていた。④Single oxygen sensor greenを用いた一重項酸素の発生の比較検討では、AcN003HPはTSと比較し、多くの一重項酸素を産生した。⑤*In vivo*でのスペクトロメーターを用いた腫瘍内への薬剤の取り込みの経時的な変化の検討では、G-chlorin e6は30分で最大に、AcN003HPは90分で最大取り込みとなった。⑥*In vivo*における抗腫瘍効果を評価し、AcN003HP PDTの強力な抗腫瘍効果を確認した。

【考察】AcN003HPは既報のG-chlorin e6同様、優れた癌細胞集積性とPDTによる殺細胞効果を示し、かつ腫瘍細胞への最大集積時間を約60分遅延させた。

【結語】AcN003HPは薬剤代謝を遅延させ、かつ非常に強力な腫瘍細胞集積性と抗腫瘍効果を示した。AcN003HPは、これまで検討した約30種類の糖連結光感受性薬剤の中で、非常に優れた次世代PDTの有望な候補薬剤の1つであると考えられた。

【審査内容】主査の瀧口教授からは、①癌治療における臨床でのPDTのメリット、デメリットについて、②*In vivo*実験でTS群が全例死亡した事実に対する容量設定の再考の必要性について、③TS及びAcN003HPの正常細胞への取り込みについて、④今後の研究の発展の方向性について、など計6項目の質問があった。第一副査の高橋教授からは、①AcN003HPとG-chlorin e6との直接比較に必要性について、②AcN003HPの光過敏予防目的の遮光期間について、③*In vivo*実験でのTS群マウスの死亡原因について、など計9項目にわたり質問がなされた。第二副査の森田教授からは、①本邦での消化器疾患におけるPDTの臨床上の問題点について、②FACS解析での細胞内への薬剤取り込みの時間的推移について、細胞レベルでの薬剤排泄の検討について、③FACS解析結果グラフの横軸の意味について、AmyCyan-Aとは何を意味するのか、など計7項目にわたり質問がなされた。これらの質問に対し、一部返答に窮することもあったが、おおむね満足すべき回答が得られ、学位論文の主旨を十分理解していると判断した。本研究は、G-chlorin e6にアセチル基を結合した新規光感受性薬剤AcN003HPを開発し、本薬剤の腫瘍への集積遅延を見出し、またAcN003HP PDTはTS PDTに比較し非常に強力な抗腫瘍効果を有することを明らかにした。よって、これらの新しい知見を報告している本論文の筆頭著者は博士（医学）の学位を授与するに相応しいと判断した。

論文審査担当者 主査 瀧口修司教授 副査 高橋 智教授、森田明理教授